

Mémoire de Maîtrise en médecine n° 1780

Etude in vitro de l'activité électrique du tissu nerveux obtenu par culture de biopsies cérébrales humaines adultes

Etudiant

Sabry Barlatey

Tuteur

Dr. Jocelyne Bloch, PD, MER
Médecin adjoint, Neurochirurgie
CHUV

Co-Tuteur

Dr. Jean-François Brunet, PhD
Directeur du Centre de production cellulaire
CHUV

Expert

Prof. Ron Stoop, Professeur associé Unil
Centre des neurosciences psychiatriques
Site de Cery

I.	Introduction	3
II.	Contexte	3
	a. Thérapies cellulaires autologues	3
	1. Primocultures de tissu cérébral humain adulte	3
	2. Transplantations autologues	5
	3. Objectifs du projet	6
	b. Micro-Electrode-Array	7
	1. Technologie Micro-Electrode-Array (MEA)	7
	2. Acquisition du signal	7
	3. Champs d'application du système	8
	c. Enregistrements par Patch Clamp	8
III.	Méthodologie	8
	a. Développement et cours des primocultures	8
	b. Procédure de différenciation neuronale induite	9
	c. Cultures sur Micro-Electrode-Array	9
	d. Immunomarquages	11
	e. Application du Patch Clamp aux primocultures	11
IV.	Résultats	12
	a. Enregistrements sur MEA	12
	b. Enregistrements par Patch Clamp	12
	c. Morphologie et phénotype cellulaire	12
V.	Discussion	13
	a. Silence électro-physiologique sur MEA	13
	b. Inconvénients du Patch Clamp appliqué aux primo-cultures	14
	c. Une optimisation nécessaire du processus de culture	14
VI.	Perspectives	15
	a. Démonstration alternative d'une activité électro-physiologique	15
	b. Développement d'une étude in vivo	15
	c. Un nouveau modèle cellulaire in vitro	16
	d. Applications fonctionnelles in vivo	16
VII.	Bibliographie	16

0. Abstract

Récemment encore, la neuro-genèse chez le primate adulte était supposée limitée aux régions précises que sont le bulbe olfactif, la zone sous-granulaire de l'hippocampe et la région sous-ventriculaire. Depuis lors, des cellules neurales progénitrices distribuées dans l'ensemble du cortex du primate adulte furent mises en évidence. Cultivées in vitro, ces cellules forment des écosystèmes cellulaires nerveux constitués de progéniteurs neuronaux, d'astrocytes et d'oligodendrocytes. Transplantés sur un modèle de primate parkinsonien, certains progéniteurs complètent leur différenciation en neurones matures et développent des propriétés neuro-trophiques et neuro-protectrices. Injectées aux environs d'une lésion cérébrale, ces cellules offrent un bénéfice fonctionnel et comportemental significatif. Le présent projet mesure l'activité électro-physiologique du tissu nerveux obtenu par culture de biopsies corticales humaines adultes, de sorte à déterminer son aptitude à intégrer l'information.

Des biopsies corticales humaines adultes furent cultivées in vitro avec succès sur un support Micro-Electrode-Array. Cette technologie permet l'acquisition d'enregistrements électro-physiologiques à l'échelle des circuits, au sein d'un tissu maintenu en culture. En parallèle, une mesure de l'activité à l'échelle cellulaire fut obtenue par l'application du Patch Clamp à des cellules cultivées sur un support de verre. Malgré une culture prolongée et l'induction d'une différenciation neuronale, aucune activité électro-physiologique significative ne put être démontrée. Une analyse phénotypique à un stade intermédiaire de culture montra l'expression prometteuse du marqueur neuronal précoce β -Tubulin-III. Cependant, après l'induction d'une différenciation neuronale, la surprenante co-expression de marqueurs astroglial (GFAP) et neuronal (MAP2) fut constatée.

Le silence électro-physiologique issu des enregistrements sur MEA peut être l'œuvre d'un isolement des cellules électriquement actives, et d'un défaut d'organisation en réseau. Une interposition de tissu glial entre neurones et électrodes peut également absorber le signal. Par ailleurs, les cellules enregistrées par Patch Clamp furent déterminées selon le seul critère morphologique ; leur nature exacte demeure inconnue. Les analyses phénotypiques laissent supposer l'entrée dans une voie de maturation neuronale par l'expression du marqueur β -Tubulin-III. Toutefois le phénotype exprimé au terme du processus de culture reste incertain. Des facteurs de maturation ou environnementaux semblent faire défaut à la complétion d'une différenciation neuronale. La culture de neurones bien différenciés et électriquement actifs appelle de nouvelles études in vivo, ainsi qu'une analyse fine des voies intracellulaires de maturation.

Mots-clés :

Progéniteurs neuronaux humains adultes, Tissu nerveux in vitro, Electrophysiologie, Micro-Electrode-Array, Patch Clamp

Titre anglais :

Electrophysiology of Adult Human Brain Cells derived from cortex biopsies in vitro

I. Introduction

Les lésions du Système Nerveux Central (SNC) engendrent fréquemment des déficits fonctionnels résiduels, qui peuvent s'avérer invalidants. Que l'atteinte soit médullaire ou cérébrale, et à l'instar du muscle cardiaque, le SNC doit sa fragilité au faible potentiel de récupération spontanée dont il fait preuve. La recherche en Neurosciences s'affaire dans ce contexte à rendre à cet organe une intégrité fonctionnelle après lésion, mettant en œuvre actuellement différentes approches dans cette perspective ; parmi elles se développent les greffes cellulaires.

Récemment encore, une approche cellulaire dans le traitement des lésions cérébrales et médullaires nécessitait l'implication de cellules souches ou dédifférenciées. Ces cellules, bien que fonctionnellement prometteuses, présentent des désavantages majeurs. Outre le débat éthique entravant l'usage de cellules embryonnaires, les cellules souches bénéficient d'une cinétique cellulaire rapide, qui favorise une transformation tumorale après leur réimplantation. De même, l'approche consistant à reprogrammer génétiquement une cellule de sorte à induire une différenciation neuronale secondaire rend incertaine la stabilité du tissu greffé. Une complication additionnelle possible réside dans le rejet immunitaire du tissu greffé.

Récemment encore, seules trois zones cérébrales étaient communément admises comme siège d'une neuro-genèse chez l'adulte : la région sous-granulaire de l'hippocampe, la zone sous ventriculaire, et le bulbe olfactif. Il y a quelques années, des cellules neurales progénitrices distribuées dans l'ensemble du cortex du primate adulte furent mises en évidence. Ces cellules, après culture *in vitro*, engendrent un tissu nerveux formé de progéniteurs neuronaux, d'astrocytes et d'oligodendrocytes. Transplantées sur un modèle de lésion dégénérative chez le primate, certaines de ces cellules complètent leur différenciation en neurones matures et développent des propriétés neuro-protectrices. Injectées en périphérie d'une lésion cérébrale, elles offrent un bénéfice comportemental et fonctionnel significatif. Toutefois, il n'a encore jamais été démontré que les cellules implantées présentant un phénotype neuronal ont une activité électrique. Le présent projet a pour but d'enregistrer *in vitro* l'activité électrophysiologique développée par ces cellules, de sorte à évaluer leur rôle potentiel comme support intégratif de l'information.

II. Contexte

II.a. Thérapies cellulaires autologues

II.a.1. Primocultures de tissu cérébral humain adulte

Au cours de travaux publiés en 2001, des amas cellulaires furent obtenus après culture de biopsies cérébrales humaines adultes, qui exprimaient les trois phénotypes principaux du SNC : progéniteurs neuronaux, astrocytes et oligodendrocytes. Ces primo-cultures étaient issues de biopsies corticales frontales et temporales, prélevées sur des sujets humains adultes. Le tissu fut dissocié et mis en culture en présence de Epidermal-Growth-Factor (EGF) et Fibroblast-Growth-Factor-2 (FGF-2). Au sein du tissuensemencé, des cellules exprimant la protéine Nestin – un marqueur neuronal précoce – induirent la formation d'amas cellulaires selon un schéma qui était alors supposé clonal. La prolifération du tissu cultivé put être confirmée par l'incorporation du marqueur Bromodésoxyuridine (BrdU), un nucléoside analogue de la thymidine s'incorporant dans l'ADN des cellules en cours de réplication et

nouvellement synthétisé. Une étude immuno-histochimique (Fig-1) du tissu obtenu en culture permet de mettre en évidence l'expression des protéines β -tubulin-III, Glial-Fibrillary-Acidic-Protein (GFAP) et O4, marqueurs respectifs des phénotypes neuronal précoce, astroglial, et oligodendroglial (1).

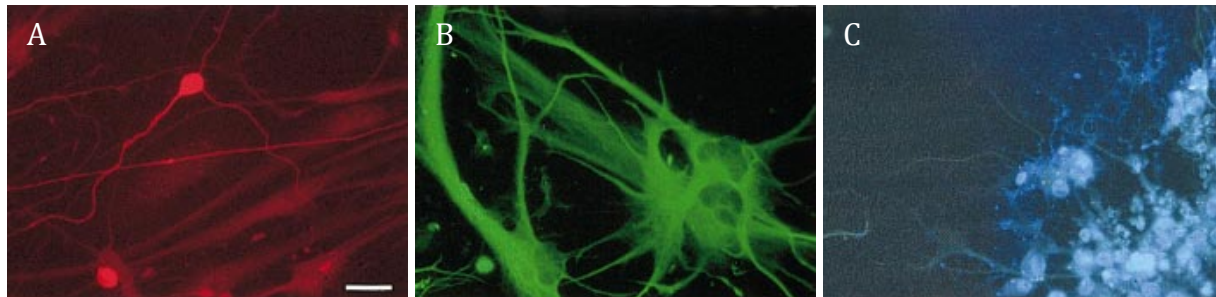


Fig-1. A. Cellule dans une voie de différenciation neuronale exprimant le marqueur β -tubulin-III. B. Cellule astrogliale GFAP positive. C. Prolongements cellulaires oligo-dendrocytaires exprimant O4.

En 2010, des travaux portant sur le marqueur cellulaire Doublecortine (DCX) furent menés. Cette protéine, marqueur des cellules neuronales en migration au cours du développement du SNC, fut mise en évidence dans l'ensemble du néocortex des primates humains et non-humains. Par une étude *in vitro* impliquant la primo-culture de biopsies cérébrales humaines adultes, ce marqueur fut associé à une survie et à une prolifération cellulaire. DCX est par ailleurs exprimé dès le premier jour de culture, avant même la présence du marqueur Nestin susmentionné.

Une analyse de l'incorporation du marqueur BrdU révéla par ailleurs un nombre stable de cellules en prolifération au cours du processus de culture, malgré l'accroissement de la population cellulaire. De plus, la quasi-totalité des cellules incorporant le BrdU co-exprimaient les marqueurs DCX et GFAP. Un schéma de prolifération asymétrique fut dès lors postulé – chaque cellule exprimant simultanément GFAP et DCX donnant naissance à une cellule progénitrice de même phénotype, et à une cellule quiescente ayant perdu l'expression du marqueur GFAP (2).

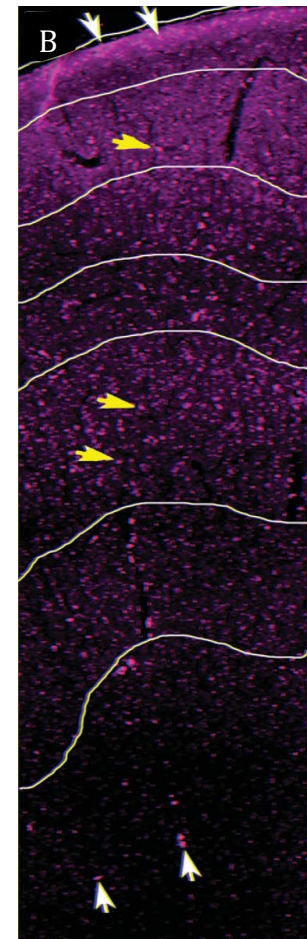
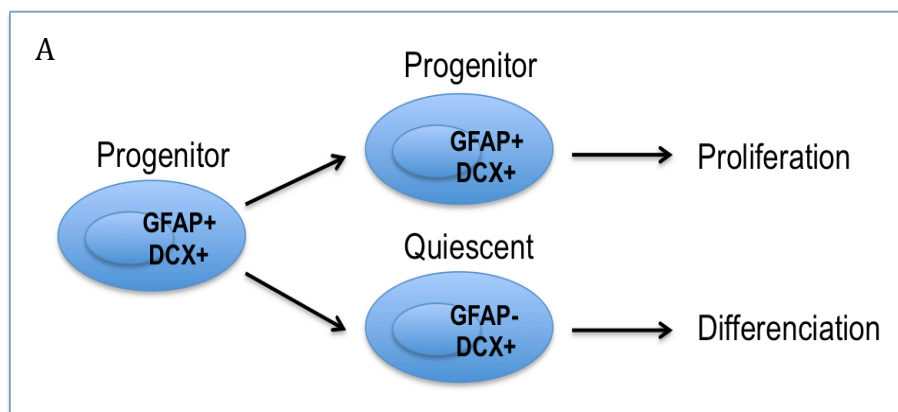


Fig-2. A. prolifération cellulaire asymétrique B. Distribution des cellules DCX positives à travers le néocortex des primates.

En vue d'un usage thérapeutique du tissu développé in vitro, il est requis de conserver les biopsies corticales afin de les mettre en culture au moment souhaité. De sorte à coordonner la mise en culture du tissu, le processus de culture et la réimplantation in vivo, un protocole de cryo-préservation du tissu cérébral humain fut développé. Le milieu de préservation est composé de DMEM-7a associé à un antibiotique/antimycotique (72%), de sérum bovin fœtal présélectionné (20%), et de DMSO (8%). Immersée dans ce milieu, les biopsies cérébrales sont alors cryogénisées à l'aide d'un système informatisé, à raison de $-1[^\circ\text{C}/\text{min}]$ jusqu'à une température de $-196[^\circ\text{C}]$. La conservation s'effectue alors dans l'azote liquide, à cette même température (3).

Dans le même temps, le protocole de culture fut empiriquement optimisé. La mise en culture de fragments corticaux complets entravant la croissance cellulaire, l'usage de fragments enrichis – en substance blanche ou en substance grise – est nécessaire. D'autre part, seul un milieu supplémenté en sérum bovin fœtal présélectionné est susceptible de supporter le développement des cellules cérébrales humaines adultes – le critère de sélection du sérum étant son aptitude à supporter le développement des primo-cultures néonatales astrogliales de souris. Désormais, le milieu de culture est composé de RPMI et de sérum bovin fœtal (20%), supplémenté en L-glutamine (1.2%), en glucose (1%) et en antimicrobiens (1.2%). Comparés, les protocoles de mise en culture reposant sur une dissociation mécanique versus enzymatique des biopsies permettent l'obtention de tissu similaire en terme de morphologie et de phénotype ; la confluence est cependant retardée par la dissociation enzymatique. Enfin, le coating du support de culture au moyen de polyornithine ou de polylysine de sorte à favoriser une adhésion cellulaire s'est avéré inutile, voire délétère (4).

II.a.2. Transplantations autologues

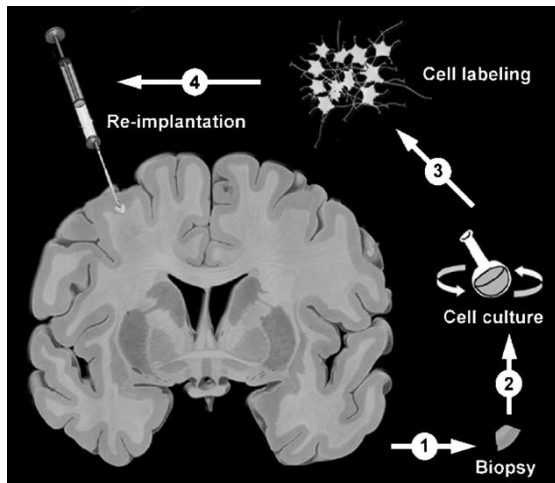


Fig-3. Protocole d'auto-transplantation; biopsie frontale, culture in vitro en suspension, marquage des cellules au PKH, réimplantation.

La production in vitro de tissu nerveux à partir de biopsies corticales est particulièrement pertinente dans l'optique de transplantations autologues. Par cette intervention, le "donneur" et le "receveur" du greffon sont un même individu ; les risques de rejets sont ainsi fortement réduits.

Dans un premier temps, il fut nécessaire de démontrer in vivo la survie du tissu réimplanté après primo-culture. Transplantées dans une région cérébrale saine, les cellules préalablement marquées aux PKH – des intercalants membranaires fluorescents – n'ont montré aucune survie cellulaire à trois mois de la greffe. Ce résultat contraste avec la survie observée lorsque le tissu est réimplanté dans une région cérébrale motrice lésée. Trois mois après leur greffe dans un contexte post-

lésionnel, des cellules furent observées jusqu'à 1 [cm] autour de la lésion, démontrant leur survie. Certaines d'entre elles, sous l'influence supposée de l'environnement, exprimaient un phénotype neuronal terminal par la présence du marqueur Microtubulin-Associated Protein 2 (MAP2), corroborant une morphologie neuronale (5).

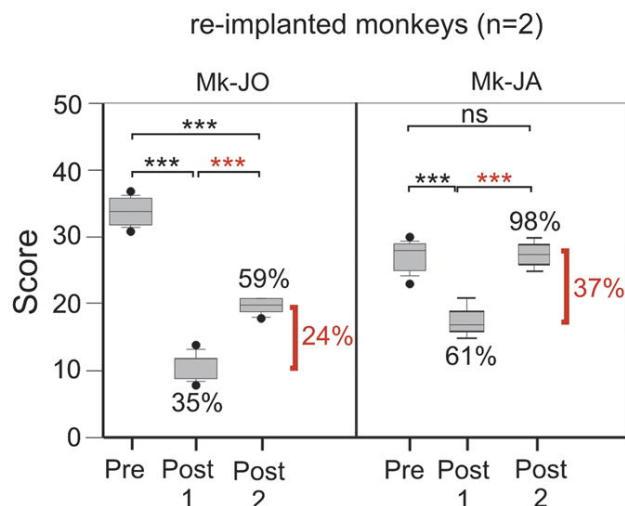


Fig-5. Plateaux de récupération fonctionnelle après auto-transplantation. **Post-1** plateau de récupération spontanée. **Post-2** second plateau avec bénéfice dû au tissu greffé.

ment, une réimplantation péri-lésionnelle provoqua la migration des cellules vers l'ensemble de la lésion. Les mécanismes inflammatoires exerçant vraisemblablement un rôle sur la migration et la différenciation des cellules réimplantées, le respect d'un délai post-lésionnel avant la transplantation semble souhaitable (6).

Au cours de transplantations autologues de tissu nerveux chez le primate non-humain, un rôle trophique des cellules réimplantées fut mis en évidence. L'étude réalisée portait sur des singes parkinsoniens asymptomatiques, préalablement traités au MPTP – une neurotoxine ciblant les neurones dopaminergiques de la substance noire. La greffe fut effectuée dans le noyau caudé droit des spécimens ; une migration cellulaire fut constatée – cohérente avec l'expression du marqueur DCX – en direction de l'ensemble du striatum réimplanté et du striatum controlatéral, via le corps calleux. Un effet neuro-protecteur distant fut postulé, les singes réimplantés démontrant une expression accrue du Glial-Derived-Neurotrophic-Factor (GDNF) au sein de la substance noire (7).

Le rôle trophique des cellules transplantées sur le modèle de primate parkinsonien est démontré. Le bénéfice observé après transplantation autologue dans un contexte de lésion corticale pourrait reposer sur un second mécanisme, les cellules greffées remplaçant les cellules lésées au sein des circuits corticaux. Cette hypothèse appelle une étude de l'activité électro-physiologique des cellules obtenues par la culture des biopsies corticales.

II.a.3. Objectifs du projet

Les premiers résultats fonctionnels et trophiques des transplantations autologues effectuées chez le primate sont prometteurs, et la greffe de primo-cultures de tissu nerveux humain

Une approche comportementale chez le primate a par la suite démontré le bénéfice fonctionnel des transplantations autologues après lésion. Après avoir été entraînés à la réalisation d'une tâche reposant sur leur motricité fine, la zone corticale motrice associée à la main fut lésée chimiquement chez des primates non-humains. Les spécimens réimplantés et contrôles montrèrent alors une récupération spontanée dans l'exercice de la tâche préalablement enseignée ; ceci jusqu'à l'atteinte d'un plateau. Deux à trois mois après la greffe, les spécimens réimplantés – et eux seuls – montrèrent une inflexion de la courbe de récupération jusqu'à l'établissement d'un second plateau, 30 à 40% au-delà de la récupération spontanée. Anatomique-

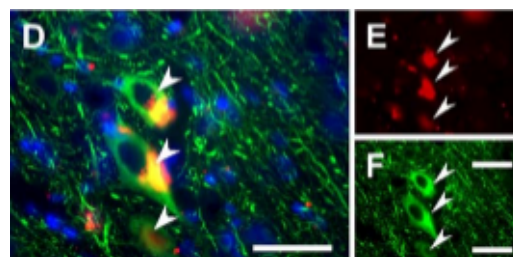


Fig-4. D. neurones matures co-exprimant PKH et MAP2 in vivo. E. expression du marqueur PKH. F. expression du marqueur MAP2.

adulte offre la perspective de nouvelles approches thérapeutiques régénératives après lésion cérébrale. Une première étude clinique impliquant des auto-transplantations chez l'humain devrait débiter prochainement. Un rôle neuro-trophique des cellules réimplantées étant désormais documenté, le présent projet tend à prouver que des primo-cultures de biopsies cérébrales humaines adultes peuvent fournir une activité électrique. L'enregistrement d'une telle activité démontrerait la capacité de ce tissu à supporter l'information au sein de circuits neuronaux, et à jouer un rôle de relai électro-physiologique après transplantation. Les primo-cultures de tissu cérébral humain adulte constitueraient dès lors un modèle *in vitro* fiable en vue de futures études électro-physiologiques en conditions pathologiques.

II.b. Micro-Electrode-Array

Différentes approches électro-physiologiques sont disponibles pour démontrer une activité électrique au sein de primo-cultures. Dans un premier temps, un système Micro-Electrode-Array (MEA) fut mis en œuvre, qui permet l'enregistrement des événements électriques à l'échelle des circuits. La culture du tissu étant effectuée directement au contact du réseau d'électrodes MEA, ce système présente un avantage ergonomique considérable.

Le Patch Clamp mesure les courants ioniques transmembranaires au moyen d'une électrode établissant un contact étroit avec les membranes cellulaires. Ce procédé, utilisé ici dans un second temps, permet la mise en évidence des potentiels d'action à l'échelle cellulaire.

II.b.1. Technologie Micro-Electrode-Array (MEA)

Le système Micro-Electrode-Array fut développé pour l'enregistrement macroscopique d'une activité électrique au sein d'un tissu maintenu en culture. Il s'applique aux coupes de tissu excitable *ex-vivo*, mais également aux cultures cellulaires. Le MEA-chip consiste en un puits de culture au fond duquel sont distribuées des électrodes formant un circuit imprimé. Chacune de ces électrodes – composées tantôt de Platine, tantôt d'un alliage d'Etain et d'oxyde d'Indium – est isolée des autres et permet l'acquisition de données discrètes respectant un maillage virtuel du tapis cellulaire ou de la coupe étudiée. Il est ainsi possible de localiser les cellules électriquement actives au sein du tissu. Lors de l'acquisition du signal, les courants sont conduits des électrodes vers un système de "pads" en Or, distribué en périphérie du puits de culture (8).

II.b.2. Acquisition du signal

Lors de l'enregistrement, le MEA-chip est coiffé d'un amplificateur de signal qui entre en contact avec le système de "pads". Au moyen d'un système informatisé, le potentiel électrique de chaque électrode est rapporté à celui d'une électrode de référence maintenue à la terre. Leurs potentiels respectifs sont dits "flottants" ; ils sont influencés par les événements électro-physiologiques survenant dans leur environnement immédiat. La plaque amplificatrice enveloppe par ailleurs le chip, de telle sorte qu'un effet 'cage de Faraday' isole le système des influences électriques extérieures. Lorsqu'un signal est enregistré, on peut ainsi conclure à une activité électrique issue du tissu étudié.

Lorsqu'aucune activité spontanée n'est détectable, ce système permet également de conduire une activité électrique des "pads" vers le circuit imprimé de manière rétrograde. Un stimulus externe permettra, le cas échéant, d'induire une activité électrique réponse au sein du tissu, qui constituera – au même titre qu'une activité spontanée – la preuve de son excitabilité (8).

II.b.3. Champs d'application du système

Le système MEA-chip a permis jusqu'ici la détection de sources électro-physiologiques au sein d'un tissu, l'analyse spatio-temporelle de l'activité de circuits neuronaux tels que l'hippocampe, l'observation du dialogue entre réseaux excitateurs et inhibiteurs au sein des colonnes corticales, ou encore l'évaluation de la neuro-toxicité de certaines substances pharmacologiques. Toutefois et à notre connaissance, aucune application du système Micro-Electrode-Array n'a encore été portée à du matériel cérébral humain.

II.c. Enregistrement par Patch Clamp

Le Patch Clamp nécessite une pipette de dimension micrométrique établissant un contact avec une membrane cellulaire. Le protocole testé ici – en collaboration avec le Centre des Neurosciences Psychiatriques de Cery – rend ce contact étanche par l'application d'une pression négative au sein de la micropipette. Lorsque le contact est constitué, la membrane est rompue localement par une brusque variation de pression, ce qui met en communication le milieu intracellulaire et la lumière de la pipette ; on crée ainsi un patch *whole cell*.

Un enregistrement des variations spontanées du potentiel transmembranaire est alors acquis. La réponse cellulaire à l'injection de courant ou au maintien d'une tension imposée peut également être mesurée.

III. Méthodologie

III.a. Développement et cours des primocultures

Des fragments corticaux enrichis en substance grise provenant des cas 84 (fille - 7 ans - épilepsie) et 93 (fille - 10 ans - épilepsie) furent développés en culture. Jusqu'alors, les fragments avaient été prélevés puis cryo-préservés dans l'azote liquide à -196°C.

Une fois extraite de l'azote liquide, la cartouche contenant le fragment est maintenue dans l'eau tiède durant une minute environ, jusqu'à l'obtention d'un milieu de conservation en phase aqueuse. Sous flux laminaire, le fragment est alors prélevé au moyen d'une pipette dont la pointe est spécialement conçue pour la dissociation des tissus. Dans une boîte de Petri, il est rincé trois fois au moyen de milieu de culture, de sorte à éliminer le DMSO, puis dans un tube à essai, il est immergé dans du milieu de culture et dissocié. Le surnageant est périodiquement récupéré, formant une suspension cellulaire qui est alors distribuée sur les supports de culture – tantôt les puits MEA, tantôt des plaques standards de 24 puits comportant des coverslips en verre de 12 mm de diamètre. Le matériel est ensuite maintenu dans un incubateur humide à 37°C, comportant une atmosphère composée de 6.5% de CO₂ et de 93.5% d'air.

Au cours de la première semaine de culture, le tissu est laissé au repos dans l'incubateur. Durant cette phase, les progéniteurs cellulaires sont spontanément sélectionnés et s'installent au fond des puits. Ce faisant, les débris vasculaires et le tissu inapte à se développer en culture forment un surnageant qui sera par la suite progressivement retiré lors des changements de milieu. Au-delà des sept premiers jours, la moitié du milieu de culture est remplacé deux fois par semaine, en aspirant de manière itérative le reliquat en suspension. A ce stade, aucun facteur de croissance spécifique, ni aucun facteur de différenciation ne supplémente le milieu de culture.

III.b. Procédure de différenciation neuronale induite

Lorsqu'une confluence est obtenue sous la forme d'un tapis cellulaire recouvrant le support de culture, une supplémentation en facteurs de différenciation est fournie de sorte à compléter et optimiser le développement des cellules pré-neuronales, dont la maturation reste incomplète. En effet, une part importante des cellules exprime à ce stade le marqueur β -tubulin-III, qui signe un stade intermédiaire dans la voie de différenciation neuronale.

Les voies de signalisation intracellulaires des progéniteurs neuraux demeurent inconnues, le protocole mis en œuvre pour compléter la maturation en neurones terminaux – exprimant le marqueur MAP2 – est donc empirique.

Cette procédure est menée selon le protocole ci-contre, sur une période de deux semaines et nécessite les différents facteurs de différenciation et de croissance listés ci-dessous :

- Composite Neurobasal Medium (N2)
- Sonic Hedgehog Factor (Shh)
- Basic Fibrillary Growth Factor (bFGF)
- Fibrillary Growth Factor 8 (FGF8)
- Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)
- Glial Derived Neurotrophic Factor (GDNF)

Day	Factors or Medium
D-1	N2
D-7	Shh – bFGF – FGF8
D-9	Shh – bFGF – FGF8 – N2
D-12	BDNF – (GDNF)
D-14	BDNF – (GDNF) – N2
D-16	ANCE
D-18	End of process

III.c. Culture sur Micro-Electrode-Array

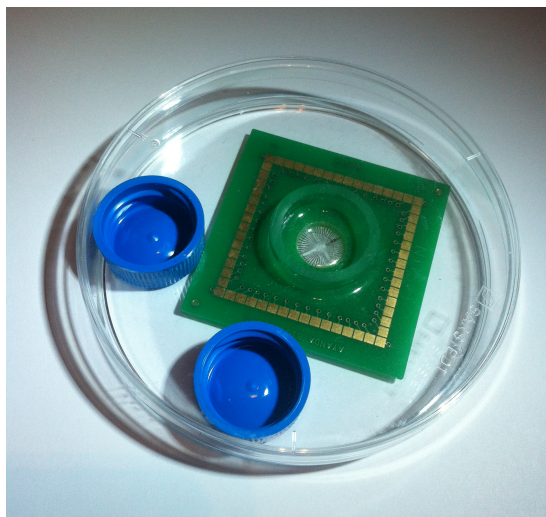


Fig-6. MEA-chip en environnement protégé avec coupelles d'humidification.

La procédure de culture sur MEA-chips est similaire à celle mise en œuvre sur les supports de culture habituels. Les particularités du système ont nécessité toutefois un aménagement de l'environnement de culture, de sorte à permettre au tapis cellulaire de se développer adéquatement.

Rapidement, une évaporation précoce du milieu de culture fut constatée lors de la soumission du système aux conditions de l'incubateur. Cet inconvénient fut contourné en coiffant chaque MEA-chip d'un bouchon, puis en les protégeant au sein de boîtes de Petri avec des coupelles d'eau filtrée et déminéralisée (Fig-6).

Par la suite, une prolifération particulièrement lente fut observée sur Micro-Electrode-Array, qui suscita deux hypothèses et précautions. Un volume de suspension cellulaire insuffisant en début de culture fut suspecté – la capacité des puits MEA étant supérieure à celle des supports de culture habituels, le nombre de progéniteurs nécessaires à l'obtention d'une confluence fut adapté à la hausse. En raison de la dynamique asymétrique des mitoses, cette population est stable au cours de la culture ; son optimisation fut obtenue par une augmentation du volume initial de suspension cellulaire par puits.

Par ailleurs, la présence de dépôts toxiques fut suspectée, issus des procédures d'usinage des chips, et potentiellement actifs sur le métabolisme des progéniteurs cellulaires. Si la présence ni le rôle de ces éventuels résidus n'a jamais été démontrée, une attention particulière fut par la suite portée à la préparation des puits MEA avant la mise en culture. Un triple nettoyage des chips à l'eau filtrée et déminéralisée fut dès lors effectué, suivi d'une désinfection alcoolique et d'un rinçage au milieu de culture, avant que la suspension cellulaire ne soit distribuée.

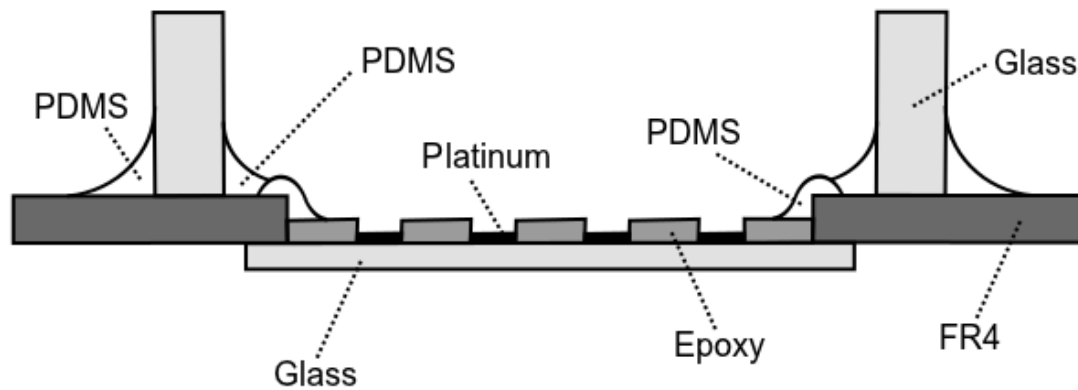
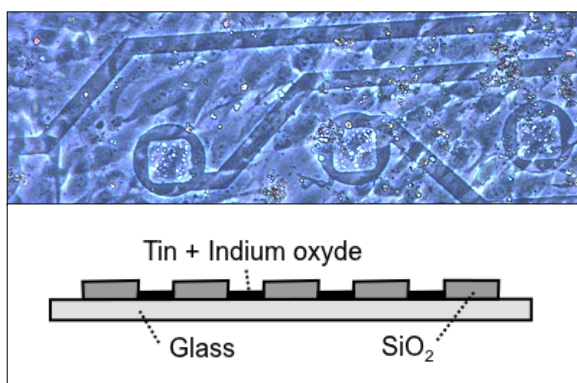
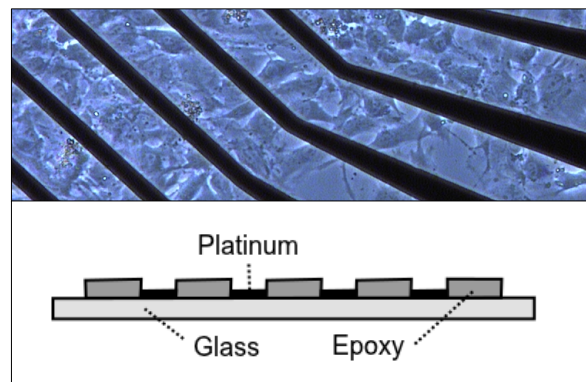
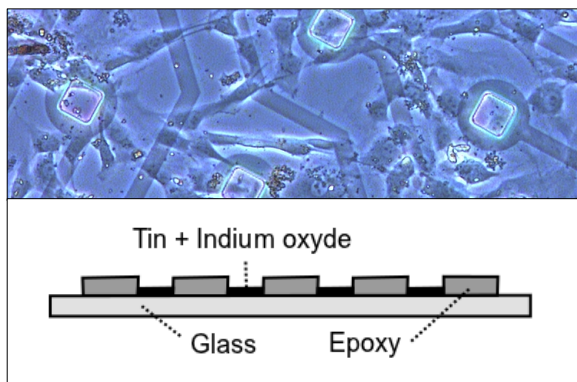


Fig-7. Composition des puits MEAs utilisés dans un premier temps : support plastique FR4, support isolant Epoxy, circuit imprimé en Platine, gel isolant en silicone PDMS, structure en verre

Lors des premières tentatives de primo-culture sur MEA, un déficit d'adhésion cellulaire au fond des puits fut rencontré. Ceci fut observé en dépit des précautions de mise en culture susmentionnées, et n'avait jamais été documenté lors du développement de tissu murin sur ce support. Le schéma original des puits MEA testés est décrit sur la figure 7.



Suspectant l'un des matériaux composant le puits de faire obstacle à l'adhésion cellulaire, nous avons extrait du système divers modèles de chips et testé individuellement différents tandems d'électrodes (E) et d'isolants (I).

Des primo-cultures purent être développées avec succès sur tous les substrats testés, à savoir des combinaisons de :

- Platine (E) et Epoxy (I)
- Etain et Oxyde d'Indium (E) et Epoxy (I)
- Etain et Oxyde d'Indium (E) et Dioxyde de Silicium SiO₂ (I)

Ayant exclu un rôle néfaste de l'un de ces composants, notre attention fut portée sur le joint faisant l'interface entre le chip et la paroi du puits. Les progéniteurs ayant tendance à adhérer prioritairement à la périphérie du puits, ils entrent précocement en contact avec ce composant. Une tentative de culture sur ce matériau – composé de silicone PDMS – se révéla infructueuse.

Postulant une interaction délétère entre ce matériau poreux et les progéniteurs cellulaires lors de leur installation au fond des puits, ce joint fut par la suite remplacé par de l'Epoxy. Sur des puits MEA complets, cette modification combinée aux précautions sus-décrites a permis un développement satisfaisant des primo-cultures débutées depuis lors.

III.d. Immunomarquages

En raison d'une auto-fluorescence du matériau isolant Epoxy utilisé dans la composition des MEAs, aucune étude phénotypique du tissu développé sur ces supports ne put être effectuée. Des cultures furent menées parallèlement sur des coverslips de verre, et le phénotype des cellules développées sur MEAs fut extrapolé des marquages sur support standard.

Les marquages immuns furent effectués selon le protocole suivant :

- Triple rinçage des coverslips au PBS
- Fixation du tissu au PFA (puis triple rinçage au PBS)
- Marquage du tissu par les anticorps primaires (puis triple rinçage au PBS)
- Révélation au moyen des anticorps secondaires (puis triple rinçage au PBS)
- Marquage des noyaux au DAPI
- Montage sur lame

Lors de chaque immuno-staining, un coverslip fut utilisé comme contrôle de réactivité des anticorps secondaires – sans marquage aux anticorps primaires – et un second comme contrôle d'auto-fluorescence – sans marquage aux anticorps primaires ni révélation.

III.e. Application du Patch Clamp aux primocultures

Des primo-cultures furent développées de manière habituelle sur des coverslips standards, conformément au protocole sus-décrit. Une différenciation fut induite au moyen du milieu N2 sur la moitié des lamelles en culture. Une fois le tissu confluent, les coverslips furent transférés dans une chambre de patch clamp, au sein de LCR artificiel. Un enregistrement unique fut ensuite effectué – la levée de l'asepsie entravant la poursuite de la culture – selon la méthode de Patch Clamp sus-décrite.

IV. Résultats

IVa. Enregistrements sur MEA

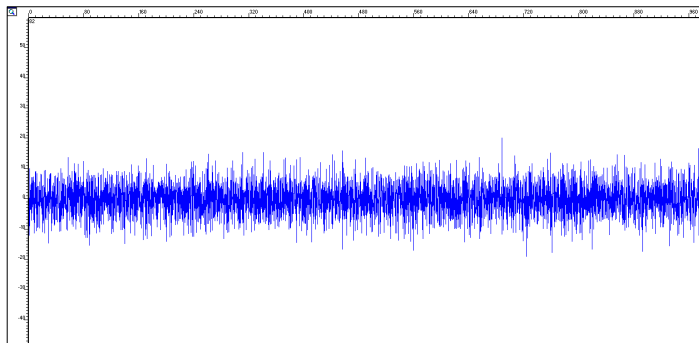


Fig-8. Enregistrement fourni par l'une des électrodes distribuées au fond des MEA-chips. Pas d'activité significative, discret bruitage.

Trois enregistrements furent obtenus sur les supports MEA de manière hebdomadaire, entre la confluence microscopique du tissu et l'induction d'une différenciation. Le cycle de trois mesures fut répété à une semaine d'intervalle dès J0 du terme de la différenciation. Tous les enregistrements obtenus montrent de manière similaire un discret bruitage, sans événement électrique significatif (Fig-8). Le maintien en culture jusqu'à J42 de la fin de différenciation fut vain du point de

vue électro-physiologique, les enregistrements obtenus étant identiques aux précédents. De même, aucune activité significative ne put être obtenue sur des cultures laissées en différenciation spontanée, sans adjonction de milieu neuro-basal N2.

IVb. Enregistrements par Patch Clamp

Des mesures par Patch Clamp furent menées à J1, J8 ou J15 de la fin du processus de différenciation neuronale induite (Fig-9). Des mesures parallèles furent acquises à titre comparatif sur du tissu en développement spontané, sans adjonction de milieu neuro-basal. Sur aucun des coverslips étudiés les cellules interrogées n'ont montré d'activité électrique, qu'elle soit spontanée, en réponse au maintien d'une tension imposée, ou successive à l'injection de courant.

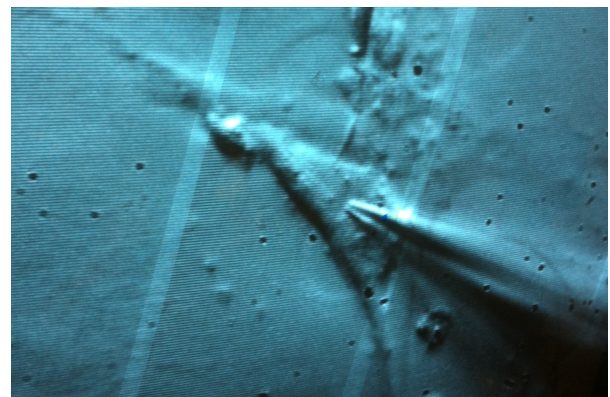


Fig-9. Micropipette de Patch Clamp au contact d'une cellule de morphologie neuronale.

IVc. Morphologie et phénotype cellulaire

Sur coverslips standards, l'observation par immunofluorescence du tissu cultivé puis différencié en milieu neuro-basal N2 a mis en évidence un nombre restreint de cellules isolées de morphologie neuronale. Les marqueurs MAP2 et GFAP sont paradoxalement co-exprimés par ces cellules (Fig-10).

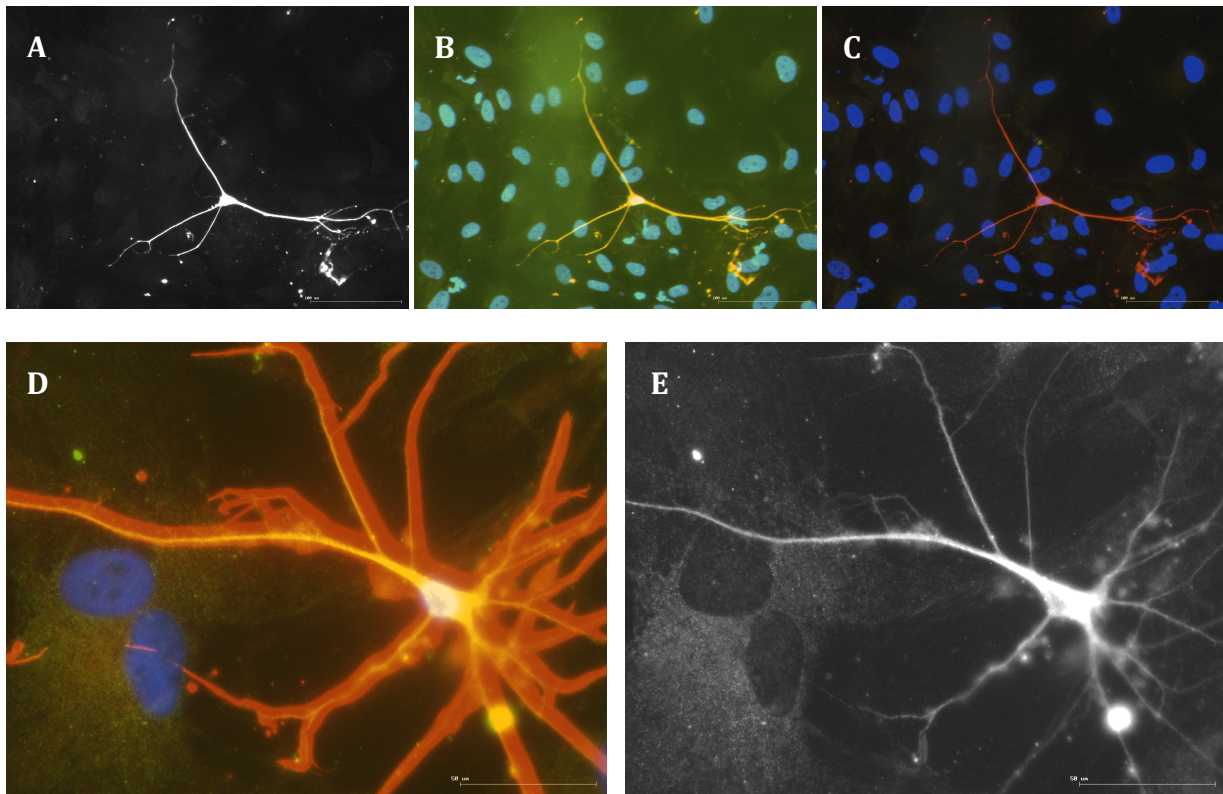


Fig-10. Immuno-stainings effectués sur coverslips de verre après différenciation induite. **A-E.** Cellules de morphologie neuronale, corps cellulaire triangulaire, zone gâchette, extension de neurites avec prolongement axon-like. **B.** Cellule MAP2 positive. **C.** Cellule GFAP positive. **D.** Co-expression de GFAP et MAP2.

Sur du tissu en développement spontané, le marqueur β -tubulin III est diffusément exprimé par un sous-groupe important de la population cellulaire (Fig-11) ; le marqueur GFAP est également fortement exprimé.

V. Discussion

Va. Silence électro-physiologique sur MEA

Les enregistrements sur MEA n'ont pas permis la mise en évidence d'un signal. Ce système de mesure dispose d'un seuil de détection en-dessous duquel les événements électriques passent inaperçus. Il nécessite un contact étroit entre le circuit cellulaire électriquement actif et les électrodes de mesure, que l'interposition de tissu glial ou d'une matrice extracellulaire peut entraver. L'activité électro-physiologique sera dès lors absorbée par le matériel non-excitable.

Par ailleurs, une activité significative sur MEA résulte de l'addition d'événements électro-physiologiques simultanés au sein d'un circuit cellulaire. Des cellules isolées peuvent produire un signal de faible intensité, passant inaperçu en raison du bruitage.

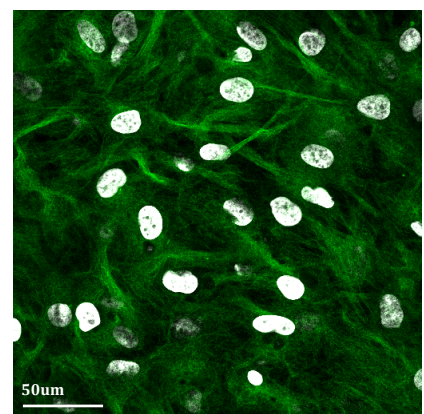


Fig-11. Immuno-staining sur coverslip de verre durant le développement spontané, sans adjonction de milieu neuro-basal. Expression du marqueur neuronal précoce β -Tubulin-III (vert).

De plus, l'absence d'activité spontanée – qui nécessite un échange d'information – peut être due à un isolement des cellules excitables. Le silence électro-physiologique constaté sur MEA sera alors imputable à l'établissement défaillant de circuits cellulaires significatifs.

Inconvénient du matériau isolant utilisé dans la conception du MEA-chip, l'auto-fluorescence de l'Epoxy dans le *vert* et le *rouge* entrave le marquage par immunohistochimie des cellules enregistrées. Cette fluorescence interfère avec les chromophores usuels, incommodant la caractérisation phénotypique du tissu. Il sera intéressant de mener des primo-cultures sur des MEA-chips constitués de dioxyde de silicium SiO₂, matériau dépourvu d'auto-fluorescences.

Vb. Inconvénients du Patch Clamp appliqué aux primo-cultures

Au cours de leur développement, les cellules acquièrent une conformation plane, dont le relief est peu accessible à l'incidence oblique des pipettes de Patch Clamp. Pour cette raison, le contact étanche nécessaire à l'établissement d'un 'whole cell patch' ne fut obtenu qu'en de rares occasions. L'approche des micropipettes fut également parasitée par l'irrégularité des membranes cellulaires, due à la formation de dépôts issus du processus de culture.

Par ailleurs, la mobilisation des corps cellulaires durant le contact membranaire est mécaniquement peu absorbée par le tissu sous-jacent. Les cellules reposant directement sur une surface solide, une manipulation indélicate des membranes provoqua fréquemment la rupture cellulaire. Cet inconvénient sera considérablement réduit en effectuant des mesures sur des coupes de tissu *ex vivo*.

Le guidage des micropipettes de Patch Clamp repose sur une microscopie optique en contraste de phase, qui permet uniquement une distinction morphologique des types cellulaires en présence. La fiabilité de cette distinction est limitée par une différenciation partielle des cellules neuronales et gliales, dont la morphologie est souvent comparable en microscopie optique. Le phénotype exact des cellules interrogées demeure incertain.

Vc. Une optimisation nécessaire du processus de culture

Le phénotype des cellules interrogées par Patch Clamp et MEAs n'a pu être précisé par les marquages effectués sur coverslips standards. Cependant, la recherche de marqueurs neuronaux durant le développement s'est révélée prometteuse, par l'expression du marqueur neuronal précoce β -tubulin-III. Suite au processus de différenciation neuronale induite, des cellules de morphologie neuronale, souvent isolées, co-expriment GFAP et MAP2.

La présence simultanée de marqueurs astroglial et neuronal terminal tend à évoquer une différenciation partielle des progéniteurs en neurones, GFAP étant exprimé précocement au cours des primo-cultures. La complétion de la maturation cellulaire nécessitera le cas échéant l'implication de facteurs de croissance et de conditions environnementales additionnels, dont la nature reste à déterminer.

Une stimulation abrupte par le milieu neuro-basal N2 et les facteurs impliqués peut également contribuer à déstabiliser le métabolisme et l'électrophysiologie cellulaire. En postulant l'organisation spontanée des primo-cultures en écosystèmes équilibrés, un enrichissement du tissu en neurones peut se révéler délétère.

Un développement incomplet du phénotype neuronal peut en outre découler d'une carence en stimuli électro-physiologiques environnementaux. Une étude des cellules corticales adultes cultivées puis réinjectées *in vivo* permettra d'évaluer leur maturation dans un environnement électriquement actif. Une telle approche pourra nécessiter la réalisation de xénogreffes de cellules de primate sur un modèle murin.

L'exploration de nouvelles voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la différenciation des progéniteurs est requise. En vue d'optimiser les procédures de culture et de

préciser les phénotypes en présence, une étude approfondie du transcriptôme et du protéôme cellulaire durant le développement des primo-cultures est nécessaire. Ces recherches devront permettre de déterminer les interventions chimiques et environnementales nécessaires à la maturation des progéniteurs en neurones terminaux.

VI. Perspectives

Vla. Démonstration alternative d'une activité électro-physiologique

Une optimisation des systèmes d'enregistrement permettra d'affiner la détection des signaux ; en parallèle, d'autres procédures sont disponibles en vue de démontrer une activité électro-physiologique.

La conduction des potentiels d'action repose essentiellement sur l'activité des canaux sodiques dépendants du voltage Na(v). Leur présence au sein du tissu, associée à l'expression du marqueur MAP2, démontrerait l'excitabilité des cellules neuronales issues de la culture des Adult Human Brain Cells. Une étude immuno-histochimique impliquant des anticorps primaires dirigés contre les canaux Na(v) est envisageable.

Des agents fluorescents sensibles au voltage ont été développés dans les dernières décennies qui, appliqués *in vitro* aux primo-cultures, sont susceptibles de démontrer leur activité électro-physiologique. Selon les substances, différents mécanismes rendent ces agents sensibles au voltage, parmi lesquels une répartition intra- ou extracellulaire selon les flux ioniques, un alignement des chromophores dipolaires selon l'orientation du champ électrique membranaire, ou encore une modification conformationnelle, voire une dimérisation de la substance selon le voltage (9). Par ces méthodes, une activité électrique peut être mise en évidence par microscopie à fluorescence.

De manière semblable, des agents sensibles aux mouvements calciques permettent de révéler les éventuelles terminaisons axonales. Les influx calciques – qui répondent aux potentiels d'action – sont nécessaires à la libération des neurotransmetteurs ; leur présence constituerait la démonstration indirecte d'une activité électro-physiologique. Ce procédé peut reposer notamment sur une transfection cellulaire au moyen de gènes dérivés de la Green Fluorescent Protein, et conçus pour révéler les modifications de concentration calcique intracellulaire (9).

Vlb. Développement d'une étude *in vivo*

La xéno greffe des cellules progénitrices dans le système nerveux central de rongeurs fournira un modèle fiable de leur développement en conditions physiologiques ou pathologiques. Si leur rôle trophique fut démontré chez le primate non-humain, le rongeur permet l'étude d'un groupe plus important de spécimens. L'influence environnementale électrique et métabolique sur la maturation des cellules sera analysée, ainsi que leur intégration au sein des circuits neuronaux hôtes. Une analyse du phénotype cellulaire à différents temps post-transplantation permettra d'établir un calendrier du processus de différenciation *in vivo*. Une étude physiologique par Patch Clamp sera également plus aisée au sein de coupes de tissu intégrant les cellules transplantées que sur des primo-cultures.

L'Indocyanine Green, un agent sensible au voltage qui peut être administré *in vivo* par voie intraveineuse permet, après sacrifice, de suivre par microscopie à fluorescence les événements électriques au sein du tissu nerveux (10). Une étude combinant la xéno-greffe chez le rongeur de cellules marquées issues des primo-cultures et la perfusion d'Indocyanine Green permettra de démontrer l'éventuelle activité électro-physiologique des cellules transplantées.

Sur un modèle de lésion cérébrale chez le rat, le bénéfice fonctionnel des transplantations de progéniteurs pourra être corrélée à une étude électro-physiologique post-mortem. Le cas échéant, la capacité du greffon à conduire les potentiels d'action sera démontrée, ainsi qu'un rôle intégratif de l'information permettant une récupération fonctionnelle. Différents modèles murins pourront ensuite être développés, de sorte à évaluer les répercussions de l'ischémie, de l'épilepsie prolongée, d'un environnement dégénératif ou d'autres conditions pathologiques sur le métabolisme et l'activité des Adult Primate Brain Cells.

VIc. Un nouveau modèle cellulaire in vitro

Par la mise en évidence d'une activité électro-physiologique du tissu issu de biopsies corticales de primates, celui-ci constituera un modèle fiable pour l'étude in vitro de diverses conditions pathologiques.

Une étude des substances pharmacologiques – nouvelles ou anciennes – ayant une activité sur le système nerveux central sera également permise par ce modèle cellulaire. Leurs propriétés et leur influence sur l'électrophysiologie et sur le métabolisme cellulaire pourront être évaluées ou précisées.

VIId. Applications fonctionnelles in vivo

La principale perspective d'une étude in vitro des Adult Human Brain Cells réside dans leur transplantation autologue sur des modèles de primates dans un premier temps, puis sur l'humain. Au cours de récents travaux, des singes parkinsoniens symptomatiques ont bénéficié de l'effet neuro-protecteur et neuro-trophique des transplantations autologues, qui ont permis une amélioration comportementale significative (11). Diverses pathologies du névraxe devraient dans le futur bénéficier d'un protocole similaire, parmi lesquelles certaines étiologies dégénératives – telles que la maladie de Parkinson – ou certaines lésions post-ischémiques ou traumatique. Les transplantations autologues fourniront idéalement un moyen de pallier les déficits fonctionnels.

Des auto-transplantations seront prochainement menées sur des cas humains après lésion ischémique étendue. Cette étude permettra une quantification de la récupération fonctionnelle associée à la greffe des Adult Human Brain Cells, ainsi que la tolérance des patients à cette intervention.

VII. Bibliographie

1. Arsenijevic Y, Villemure J-G, Brunet J-F, Bloch JJ, Déglon N, Kostic C, et al. Isolation of Multipotent Neural Precursors Residing in the Cortex of the Adult Human Brain. *Experimental Neurology*. 2001;170(1):48 – 62.
2. Bloch J, Kaeser M, Sadeghi Y, Rouiller EM, Redmond DE, Brunet J-F. Doublecortin-positive cells in the adult primate cerebral cortex and possible role in brain plasticity and development. *The Journal of Comparative Neurology*. 2011;519(4):775–89.
3. Brunet J-F, Pellerin L, Magistretti P, Villemure J-G. Cryopreservation of human brain tissue allowing timely production of viable adult human brain cells for autologous transplantation. *Cryobiology*. 2003;47(2):179 – 183.

4. Brunet J-F, Pellerin L, Arsenijevic Y, Magistretti P, Villemure J-G. A Novel Method for In Vitro Production of Human Glial-Like Cells from Neurosurgical Resection Tissue. *Lab Invest.* 2002 Jun 1;82(6):809–12.
5. Brunet J-F, Rouiller E, Wannier T, Villemure J-G, Bloch J. Primate adult brain cell autotransplantation, a new tool for brain repair? *Experimental Neurology.* 2005;196(1):195 – 198.
6. Kaeser M, Brunet J-F, Wyss A, Belhaj-Saif A, Liu Y, Hamadjida A, et al. Autologous Adult Cortical Cell Transplantation Enhances Functional Recovery Following Unilateral Lesion of Motor Cortex in Primates: A Pilot Study. *Neurosurgery.* 2011;68(5):1405–1417
7. Brunet J-F, Redmond DE, Bloch J. Primate Adult Brain Cell Autotransplantation, a Pilot Study in Asymptomatic MPTP-Treated Monkeys. *Cell Transplantation.* 2009;18(7):787–99.
8. Egert U, Schlosshauer B, Fennrich S, Nisch W, Fejtl M, Knott T, et al. A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays. *Brain Research Protocols.* 1998;2(4):229 – 242.
9. Peterka DS, Takahashi H, Yuste R. Imaging Voltage in Neurons. *Neuron.* 2011 Jan 13;69(1):9–21.
10. Treger JS, Priest MF, Iezzi R, Bezanilla F. Real-Time Imaging of Electrical Signals with an Infrared FDA-Approved Dye. *Biophysical Journal.* 2014 Sep 16;107(6):L09–L12.
11. Bloch J, Brunet J-F, McEntire CRS, Redmond DE. Primate adult brain cell autotransplantation produces behavioral and biological recovery in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonian St. Kitts monkeys. *J Comp Neurol.* 2014 Aug 15;522(12):2729–40.